



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2007 023 183 A1 2008.11.20**

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 023 183.2**
 (22) Anmeldetag: **18.05.2007**
 (43) Offenlegungstag: **20.11.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 16/28 (2006.01)**
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01)

(71) Anmelder:
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE),
20251 Hamburg, DE

(72) Erfinder:
Neuber, Karsten, Prof. Dr. med., 22609 Hamburg,
DE

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
WO 06/0 82 066 A1
WO 98/04 592 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verwendung von Autoantikörpern gegen CD28 als prognostischer Marker beim malignen Melanom**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom, bei dem man eine Probe von einem Patienten auf das Vorhandensein von anti-CD28 Autoantikörpern untersucht, indem man die Probe mit CD28 in Kontakt bringt, wobei eine Bindung der Autoantikörper an CD28 auf eine signifikant schlechtere Überlebensprognose des Patienten mit malignem Melanom hinweist. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von CD28 als Nachweisreagenz für anti-CD28 Autoantikörper zur Diagnose der genannten Erkrankungen und ein zu diesem Zweck gedachtes Kit, das CD28 und markierte anti-Immunglobulin-Antikörper umfaßt.

Tabelle 1.

Charakteristika	Patienten (n = 116)
Alter [Jahre]	
Median	56.7
Geschlecht [Anzahl (%)]	
Männlich	67 (58)
Weiblich	49 (42)
AJCC Stadium [Anzahl (%)]	
IIIA	24 (20.6)
IIIB	46 (39.7)
IIIC	46 (39.7)

Beschreibung

1. Gegenstand der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom, bei dem man eine Probe von einem Patienten auf das Vorhandensein von anti-CD28 Autoantikörpern untersucht, indem man die Probe mit CD28 in Kontakt bringt, wobei eine Bindung der Autoantikörper an CD28 auf eine signifikant schlechtere Überlebensprognose des Patienten mit malignem Melanom hinweist. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von CD28 als Nachweisreagenz für anti-CD28 Autoantikörper zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom und ein zu diesem Zweck gedachtes Kit, das CD28 und markierte anti-Immunglobulin-Antikörper umfaßt.

2. Stand der Technik

[0002] Das maligne Melanom ist ein äußerst aggressiver Tumor, der von den Melanozyten in der Haut oder anderen Organen ausgeht und frühzeitig metastasiert. Die Standardtherapie des malignen Melanoms besteht in der möglichst frühzeitigen Exzision des Primärtumors. In den fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung gibt es einige unspezifische Parameter, die die Prognose des Krankheitsverlaufs sowie der Überlebensrate beeinflussen. Dazu gehört die Erhöhung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum sowie ein schlechter Allgemeinzustand. Spezifische Prognoseparameter, die zum Beispiel mit bestimmten Funktionen des Immunsystems assoziiert sind, wurden bisher nicht beschrieben (Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol 2001; 19: 3635–48.). Als Tumormarker hat sich in den letzten Jahren der Nachweis des S100 Proteins im Serum etabliert. Wie bei anderen Tumormarkern auch ist S100 allerdings nur als Verlaufsparemeter bei Patienten mit weit fortgeschrittenen Melanomen geeignet und gibt lediglich Hinweise auf ein Tumorrezidiv. Die Prognose des einzelnen Patienten ist nicht mit der Höhe der S100-Spiegel im Serum korreliert (Harpio R, Einarsson R. S100 Proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. Clin Biochem 2004; 37: 512–8).

[0003] Um bei Patienten mit malignem Melanom eine Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens stellen zu können, besteht ein Bedarf, ein entsprechendes Diagnoseverfahren bereit zu stellen. Da das Melanom im fortgeschrittenen Stadium eine lebensbedrohliche Erkrankung ist, die sehr häufig zum Tod des Patienten führt, ist die Prognose von wesentlicher Bedeutung, um das weitere Therapieschema entsprechend darauf abzustellen und Therapiemaßnahmen zu ergreifen, die geeignet sind, die Überlebensprognose zu verbessern. Praktische Konsequenzen aus der Prognose können zum Beispiel eine intensiviertere klinische Überwachung und Diagnostik bei Patienten mit CD28-positivem Autoantikörper-Status (CD28+ Ak-Status), möglicherweise das Absetzen der IFN α -Therapie oder sogar eine immunsuppressive Therapie sein.

[0004] Die vorliegende Erfindung befriedigt diesen Bedarf und stellt erstmals ein Verfahren zur Verfügung, mit dem sich die Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom semiquantitativ bestimmen lässt.

3. Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom, bei dem man eine Probe von einem Patienten auf das Vorhandensein von anti-CD28 Autoantikörpern untersucht, indem man die Probe mit CD28 in Kontakt bringt, wobei eine Bindung der Autoantikörper an CD28 auf eine – im Vergleich zu Patienten ohne anti-CD28 Autoantikörper – signifikant schlechtere Überlebensprognose des Patienten mit malignem Melanom hinweist.

[0006] Die vorliegende Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen CD28 in Patientenproben, vorzugsweise im Plasma und besonders bevorzugt im Serum von Patienten mit malignem Melanom, ein statistisch signifikanter Marker für die Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens der Patienten ist. Diese Autoantikörper treten vermehrt bei Hochrisiko-Melanompatienten auf, die adjuvant mit Interferon-alpha (IFN α) behandelt werden und verschlechtern bei diesen Patienten auch das Gesamtüberleben. Daher stellt die Diagnostik von Autoantikörpern gegen CD28 einen neuen Parameter für differenzierte Therapieentscheidungen und für die Prognose bei Patienten mit malignem Melanom dar. Das heißt, dass man erfindungsgemäß anti-CD28 Autoantikörper als prognostischen Marker zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom verwendet.

[0007] Unter „Überlebensprognose“ wird vorliegend sowohl das progressionsfreie Überleben (PFS) als auch das Gesamtüberleben (OS) der Patienten verstanden.

[0008] Die Erkenntnis, dass das Vorhandensein von anti-CD28 Autoantikörpern ein statistisch signifikanter, prognostischer Marker bei Patienten mit malignem Melanom ist, ist umso überraschender, als das Auftreten von verschiedenen Autoantikörpern oder von Autoimmunerkrankungen unter der adjuvanten Immuntherapie mit IFN α – die sich inzwischen in Stadien mit großen Primärmelanomen oder regionärer Metastasierung als Standardtherapie etabliert hat (Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ et al., a. a. O.; Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS et al. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. J Clin Oncol 1996; 14: 7–17) – die Prognose von Melanompatienten mit hohem Metastasierungsrisiko statistisch signifikant verbessert (Gogas H, Ioannovich J, Dafni U et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. N Engl J Med 2006; 354: 709–18). Im Fall des malignen Melanoms hingegen verringert sich das progressionsfreie Überleben (PFS) signifikant, und das Gesamtüberleben (OS) der Patienten verringert sich hochsignifikant.

[0009] Die Erfindung umfasst den semiquantitativen Nachweis von humanen Autoantikörpern gegen CD28 in Patientenproben, vorzugsweise in Blutproben oder im Plasma und besonders bevorzugt im Serum von Patienten mit malignem Melanom, mit Hilfe eines ELISAs, der hierin näher beschrieben ist.

[0010] Bei Melanompatienten im Stadium III ist der Nachweis von Autoantikörpern gegen CD28 mit einem signifikant verschlechterten Gesamtüberleben verbunden. Das gleichzeitige Vorhandensein von anderen Autoantikörpern (ANA, anti-Schilddrüsen-Ak), die möglicherweise die Prognose verbessern, kann diesen prognostisch ungünstigen Effekt nur unwesentlich ausgleichen.

[0011] Die Erfindung ermöglicht es erstmals, Melanompatienten mit einer schlechteren Überlebensprognose zu identifizieren und daraus therapeutische Konsequenzen abzuleiten. Zum einen sollten Patienten, die Autoantikörper gegen CD28 im Serum haben, keine Therapie mit IFN α erhalten, weil dadurch noch höhere Serumtititer der Autoantikörper gegen CD28 induziert werden können. Zum anderen sollte bei Patienten, die unter einer IFN α -Therapie Autoantikörper gegen CD28 entwickeln, die Immuntherapie abgebrochen werden. Alternativ käme auch der Einsatz von z. B. Interleukin-2 (IL2) oder Chemotherapie in Betracht.

[0012] Im Rahmen dieser Erfindung wird als CD28 ein CD28-Molekül ganzer Länge gemäß SEQ ID NO:1 oder ein extrazelluläres Fragment davon gemäß SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:6 bezeichnet, das von anti-CD28 Autoantikörpern erkannt werden kann. Das extrazelluläre Fragment von CD28 umfasst die in CD28 ganzer Länge vorkommenden Aminosäuren mit Ausnahme des intrazellulären Teils und der transmembranen Region. Die Sequenz gemäß SEQ ID NO:6 beschreibt die Sequenz des humanen extrazellulären Fragments, und SEQ ID NO:2 ein um insgesamt fünf Aminosäuren kürzeres Fragment.

[0013] Die Sequenz von humanem CD28 ganzer Länge ist in SEQ ID NO:1 angegeben. Neben humanen CD28-Molekülen oder Fragmenten davon sind jedoch auch CD28-Proteine oder Fragmente davon aus anderen Spezies im Rahmen dieser Erfindung umfasst, wie z. B. aus Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Hund, Katze, Pferd oder Rind (sogen. Speziesvarianten).

[0014] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind neben den extrazellulären Fragmenten gemäß SEQ ID NO:6 oder SEQ ID NO:2 auch Fragmente (Teile) dieser Sequenzen eingeschlossen, d. h. Teilsequenzen dieser explizit genannten Fragmente, die ebenso wie die längeren CD28-Fragmente zum Nachweis von anti-CD28 Autoantikörpern geeignet sind. Erfindungsgemäß ebenfalls eingeschlossen sind Derivate dieser Fragmente und Teilsequenzen, die sich von diesen durch Austausch einzelner, vorzugsweise weniger Aminosäuren unterscheiden. Dabei werden selbstverständlich solche Sequenzvarianten gewählt, die nach wie vor zum Nachweis von anti-CD28 Autoantikörpern geeignet sind. Vorzugsweise werden solche kürzeren Teile des extrazellulären CD28-Fragments oder Sequenzvarianten derselben gewählt, die noch eine ausreichende, vorzugsweise hohe Spezifität und/oder Selektivität beim Nachweis von anti-CD28 Autoantikörpern ermöglichen.

[0015] Das CD28-Molekül ganzer Länge oder extrazelluläre Fragmente davon können Teil eines Fusionsproteins sein. Bevorzugt umfasst das Fusionsprotein ferner Glutathion-S-Transferase oder ein Histidin-Tag, wobei dies besonders zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins hilfreich ist. Grundsätzlich kann CD28 aus Zellen aufgereinigt oder rekombinant hergestellt sein. Das Fusionsprotein kann einen Ig (Immunglobulin)-Teil umfassen, es ist jedoch bevorzugt, daß dieser nicht in dem Fusionsprotein enthalten ist, so daß Schwierigkeiten mit möglicher Kreuzreaktivität von im Patientenserum vorkommenden Autoantikörpern gegen den Ig-Teil vermieden werden. CD28 kann jedoch aus CD28-Ig-Fusionsmolekülen abgespalten werden, z. B. mit Trypsin.

[0016] Die Probe eines Patienten ist bevorzugt eine Blutprobe oder eine Serumprobe. Das erfindungsgemäße Verfahren wird im Allgemeinen in vitro durchgeführt.

[0017] Bevorzugt ist CD28 an einen Träger gebunden. Ein solcher fester Träger kann z. B. eine ELISA-Platte, ein magnetisches Kügelchen oder eine Blotfolie, z. B. eine Nitrozellulosefolie, sein. Als Träger werden im Rahmen der Erfindung auch Zellen bezeichnet, die CD28 natürlicherweise oder rekombinant an ihrer Oberfläche exprimieren. CD28 kann direkt an den Träger gebunden, oder, z. B. über Antikörper, insbesondere Antikörper gegen einen mit CD28 verbundenen Tag, wie Glutathion-S-Transferase, an einen Träger gekoppelt werden. Diese Antikörper sind keine humanen Antikörper, um Kreuzreaktionen mit sekundären Antikörpern zu verhindern.

[0018] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Bindung von anti-CD28 Autoantikörpern an CD28 untersucht, indem man den Träger mit markierten anti-Immunglobulin-Antikörpern gegen Antikörper der Spezies, der der Patient angehört, kontaktiert, und man die markierten Antikörper nachweist. Beispielsweise kann der Patient ein Mensch sein. In diesem Fall wird bevorzugt humanes CD28 verwendet, und die anti-Immunglobulin-Antikörper sind anti-humane Immunglobulin-Antikörper.

[0019] Bevorzugt sind die anti-Immunglobulin-Antikörper spezifisch für Antikörper des IgG-Isotyps, sie können jedoch auch gegen IgG und IGM und/oder IgE reaktiv sein.

[0020] Bevorzugt sind die anti-Immunglobulin-Antikörper mit einem Enzym, beispielsweise Alkalischer Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase, Biotin, einem radioaktiven Isotop oder einem Fluoreszenzfarbstoff, z. B. Fluoresceinisothiozyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) markiert.

[0021] Die Untersuchung kann in einem Blot, z. B. einem Dotblot oder einem Westernblot, einem ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), einem RIA (Radioimmunoassay), einer FACS (Fluorescence activated cell sorting)-Untersuchung oder auch in einem Flüssigphasendetektionssystem durchgeführt werden. Sind die Träger Zellen, so findet die nachfolgende Untersuchung der Bindung bevorzugt im FACS oder fluoreszenzmikroskopisch statt.

[0022] Ebenfalls wird ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellt. Bevorzugt umfasst dieses Kit CD28 und markierte anti-Immunglobulin-Antikörper.

[0023] Das CD28 umfasst bevorzugt ein CD28-Molekül ganzer Länge gemäß SEQ ID NO:1 oder ein extrazelluläres Fragment davon gemäß SEQ ID NO:2. Bevorzugt handelt es sich um humanes CD28 und markierte anti-humane Immunglobulin-Antikörper, insbesondere anti-humane IgG-Antikörper.

[0024] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Kit ferner markierte anti-IgE-Antikörper und ist damit dazu geeignet, diagnostische Tests zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom sowohl auf Basis der Feststellung der Konzentration an Gesamt-IgE als auch auf Basis des Nachweises von CD28 Autoantikörpern durchzuführen, da hohe IgE-Spiegel ein Indiz dafür sein können, dass eine geringere Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung eines Melanoms besteht. Das Kit kann weiterhin unmarkierte anti-IgE-Antikörper umfassen, so dass der Test auf Gesamt-IgE als Sandwich-ELISA durchgeführt werden kann. Die unmarkierten Antikörper können polyklonale anti-IgE-Antikörper sein, die markierten anti-IgE-Antikörper können polyklonal oder monoklonal sein. Alternativ können die markierten und die unmarkierten anti-IgE Antikörper beide jeweils monoklonale Antikörper sein, die jedoch gegen ein unterschiedliches Epitop gerichtet sein müssen.

[0025] Die in dem Kit enthaltenen markierten Antikörper können mit einem Enzym, z. B. alkalischer Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase, Biotin, einem radioaktiven Isotop oder einem Fluoreszenzfarbstoff, z. B. FITC oder PE, markiert sein.

[0026] Schließlich betrifft die Erfindung noch die Verwendung von anti-CD28 Autoantikörpern als prognostischer Marker zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom und somit die Verwendung eines hierin beschriebenen Kits zur Bestimmung von anti-CD28 Autoantikörpern als prognostischer Marker für die Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom.

[0027] Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen weiter erläutert.

BEISPIELE

[0028] Anti-CD28 Autoantikörper sind durch verschiedene Methoden nachweisbar, wie z. B. durch Blot-Techniken (Beispiel 1).

[0029] In einer bevorzugten Ausführungsform wurden Seren von Melanompatienten mit hohem Metastasierungsrisiko, d. h. in den Stadien II und III (AJCC 2002), mit einem ELISA zum Nachweis von Autoantikörpern gegen CD28 untersucht (Beispiel 3). Dabei wurde ein Fusionsprotein von CD28 mit Glutathion-S-Transferase verwendet (Beispiel 2).

Beispiel 1:

Enzymatische Spaltung des rekombinanten CD28-Ig Fusionsprotein mit Trypsin und Nachweis von Autoantikörpern gegen CD28 im Immunoblot

[0030] Das rekombinante CD28-Ig Fusionsprotein (R & D Systems Inc. Minneapolis, USA) wurde in PBS-Puffer (2,7 M NaCl, 54 mM KCl, 87 mM Na₂HPO₄, 30 mM KHPO₄, pH 7,4) in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und 100 µl dieser Lösung wurden mit 50 µl Trypsin (10 mg/ml) bei 37°C für 15 Minuten verdaut. Am Ende der Inkubationszeit wurden 1,5 µl Aprotinin (10 mg/ml) und 2,5 µl TLCK (N α -p-Tosyl-L-lysin-chlormethylketon, 20 mg/ml) hinzugefügt, um die enzymatische Aktivität von Trypsin zu hemmen. Die Lösung kann bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

[0031] Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE) wird nach der Methode von Lugh-tenberg et al. (Lughtenberg, B. (1975), FEBS Lett. 58, 254) durchgeführt. Die Spaltprodukte wurden durch SDS-Gel Elektrophorese (10%iges Gel) mit einem 4% Sammelgel (110 V, 150 Minuten) unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Anschließend wurden die Spaltprodukte bei einer Stromstärke von 50 mA 3 Stunden lang auf PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen (Segin-Blot, Biorad, Germany) transferiert. Anschließend wurden die Membranen mit 5% Magermilchpulver für 60 Minuten bei Raumtemperatur blockiert und mit PBS dreimal gewaschen.

[0032] Die Sensitivität und Spezifität des Immunblots wurde mit den folgenden Antikörpern kontrolliert: monoklonaler Maus antihuman CD28 Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, USA), 1:5.000 in PBS verdünnt, biotinylierter polyklonaler Maus anti-human CD28 Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, USA), 1:5.000 in PBS verdünnt, monoklonaler Maus anti-human Fc Antikörper (Dianova, Hamburg, Germany), 1:10.000 in PBS verdünnt, und polyklonaler Kaninchen anti-human IgG Antikörper (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 1:3.500 in PBS verdünnt.

[0033] Ein Spaltprodukt des CD28-Ig Fusionsproteins wird eindeutig nur von den Anti-CD28 Antikörpern erkannt, nicht aber von Antikörpern gegen IgG oder Fc.

[0034] Zum Nachweis der Autoantikörper gegen CD28 im Serum wurden die in Streifen geschnittenen PVDF-Membranen in 1:10 verdünntem humanem Serum für 1 Stunde auf einem Schwenktisch bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrollen dienten spezifische Antiseren gegen humanes Fc (Dianova, Hamburg) und humanes CD28 (R&D, Wiesbaden). Anschließend wurden die Blots wieder dreimal gewaschen und dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem sekundären, AP-konjugierten Antikörper gegen humanes IgG (Fa. Ser-va, Heidelberg) inkubiert. Die Bindung wurde durch eine enzymatische Farbreaktion (BCIP/NBT, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitroblue tetrazolium chloride) sichtbar gemacht.

[0035] Mit Hilfe des Immunoblots können im Serum spezifische IgG-Antikörper gegen CD28 nachgewiesen werden.

Beispiel 2:

Herstellung eines CD28-GST-Fusionsproteins

RNA-Präparation aus humanem Vollblut

[0036] Zunächst wurde aus humanem Vollblut mit Hilfe des QIAamp RNA Blood Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Katalognummer: 52304) RNA präpariert.

RT-PCR zur Herstellung von cDNA

[0037] 5 µg der präparierten RNA wurden mit dem superscript-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) mit random hexamer-Primern (Katalognummer: 53034) in Blut-cDNA umgeschrieben.

Klonierung der CD28 cDNA

[0038] Anschließend wurde der für den extrazellulären Bereich (IgG-artige Domäne, ohne Transmembranregion und Signalpeptid) dieses Proteins kodierende cDNA-Bereich mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Referenz diente die online bei NCBI abfragbare Sequenz NM_006139 (SEQ ID NO: 3).

[0039] Die amplifizierte cDNA kodiert für die Aminosäuresequenz: PSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLS-CKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYL-QNLYVNQTDIYFCKIEVMPYPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFL (SEQ ID NO: 2)

[0040] Als Primer dienten:

Sense 5'-AAAGAATTCCCTTCAATTCAAGTAACAGGAAAC-3'

(SEQ ID NO: 4)

Antisense 5'-AAACCCGGGAAATAGGGGACTTGGACAAAG-3'

(SEQ ID NO: 5)

[0041] Die Integration der cDNA in die multiple-cloning-site des Vektors pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences, Freiburg, Katalognummer: 27-4580-01) erfolgte über Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und SmaI, die bereits in die zur Amplifikation eingesetzten Primer 5' integriert waren (in der Primersequenz unterstrichen). Dazu wurde das PCR-Amplifikat ebenso wie der Vektor pGEX-4T-1 zunächst mit SmaI (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Katalognummer: #R0141S) und anschließend mit EcoRI (New England Biolabs, Katalognummer #R0101S) im Reaktionspuffer NEB4 bei 20°C bzw. 37°C für jeweils zwei Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der geschnittenen DNA über das Agarose Gel DNA Extraction-Kit der Firma Roche (Basel, Katalognummer: 1696505). Der linearisierte Vektor wurde anschließend dephosphoryliert, wozu die eluierte DNA bei 37°C mit 10 U alkalischer Phosphatase (Roche, Katalognummer: 713023) nach Zugabe des entsprechenden Puffers inkubiert wurde. Die Restriktionsansätze wurden anschließend in einem einprozentigen Agarose-Gel bei 100 V aufgetrennt. Nach Ethidium-Bromid-Färbung konnte eine Bande von ca. 400 bp auf einem UV-Transilluminator visualisiert und ausgeschnitten werden. Die geschnittene cDNA wurde dann mit Hilfe des Roche Agarosegel-Elution kits in 50 µl H₂O eluiert. Anschließend wurde ein Ligationsansatz mit T4-Ligase (Invitrogen, Katalognummer: E111-01), 100 ng Vektor und 200 ng cDNA-Fragment angesetzt und bei 12°C mehrere Stunden inkubiert. Hieraus ergibt sich ein Konstrukt, bei dem die Glutathion S-Transferase 5'-wärts des im Leserahmen befindlichen CD28-Bereichs liegt.

[0042] Anschließend wurden kompetente Bakterien (XL1 Blue, HB 101) mit einem Fünftel des Ligationsansatzes transformiert. Dazu wurde zu 50 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien ein Fünftel eines Ligationsansatzes oder 0,5 µg einer DNS-Präparation hinzupipettiert und 30 min auf Eis inkubiert.

[0043] Anschließend wurden die Bakterienansätze 5 min auf 37°C erwärmt. Danach wurden 950 µl SOC Medium zugegeben und zwischen 50 µl und 1 ml des Ansatzes auf LB-Agar-Platten mit 150 µg/ml Ampicillin mit einer Pipette gleichmäßig ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

[0044] Einzelne Kolonien transformierter Bakterien wurden in 2,5 ml Medium mit entsprechendem Antibiotikumszusatz angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden dann bei 2400 g pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µl STET (8% Sukrose, 5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA) mit 1 µg/ml Lysozym auf dem Schüttler resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 Minuten auf 95°C erhitzt und dann 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde nun mit einem Zahnstocher entfernt und verworfen. Dem Überstand wurden 10 µl 5%iger CTAB-Lösung (Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid) zugegeben, kurz geschüttelt und das Präzipitat bei 16000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 300 µl 1,2 M NaCl auf dem Schüttler gelöst. Dann wurden 750 µl Ethanol 100% zugegeben, der Ansatz kräftig geschüttelt und bei 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet nun in 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, 5 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das DNA-Pellet wurde nun getrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen.

[0045] Die Richtigkeit der Sequenz des eingefügten Bereichs erfolgte durch anschließende Sequenzierung.

Präparation des rekombinanten CD28-GST-Fusionsproteins

[0046] Kompetente BL21-RILsuppl. Bakterien (ein proteasedefizienter E. coli-Stamm) wurden mit dem cD-

NA-Konstrukt transformiert und nach halbstündiger Vorinkubation in SOC-Medium bei 37°C auf LB-Agar-Platten mit 150 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Nach 14stündiger Inkubation wurde eine 30 ml LB-Medium mit Ampicillin mit einer Kolonie beimpft.

[0047] Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Diese wurde dann in 500 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und bis zu einer optischen Dichte von 0,6–0,8 bei 600 nm unter ständigem Schütteln bei 37°C inkubiert (ca. 1,5 Stunden).

[0048] Sobald diese Dichte erreicht war, wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG (Isopropyl bD-thiogalactopyranosid, Biomol, Hamburg, Katalognummer: 05684-1) induziert. Nach ca. 4 Stunden wurden die Bakterien bei 4000 g und 4°C für 10 Minuten pelletiert, der Kulturüberstand verworfen und das Pellet in 5–10 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde nun fünfmal einer Ultraschallbehandlung von je 10 Sekunden Dauer unterzogen (Branson Sonifier 250, Stufe 6) und anschließend 20 Minuten bei 30000 g zentrifugiert. Nun erfolgte die Affinitätsreinigung über den GST-Tag. Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Katalognummer: 27-4574-01) wurde bis zu einem Bettvolumen von 1 ml in eine gravitationsgetriebene Polypropylensäule geladen und in einem fünffachem Volumen PBS äquilibriert.

[0049] Anschließend wurde das Bakterienlysat aufgeladen und der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben. Der zweite Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit dem fünf- bis zehnfachen des Bettvolumens PBS gewaschen. Eluiert wurde in 10 mM reduziertem Glutathion, 50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 10% Glycerol.

[0050] Das eluierte Protein wurde anschließend aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt.

Benötigte Materialien

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
STET	8% Sucrose 0,1% Triton X 50 mM EDTA 50 mM Tris pH 8
TAE50	2 M Tris Base 5,71% Eisessig 50 mM EDTA
TE	20 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA
Auftragpuffer × 5 (für Nukleinsäuren)	40% Sucrose 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylene X in TE
SOC Medium	2% bacto-trypton 0,5% Bacto Hefe Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 5 N NaOH auf pH 7,0
Autoklavieren und anschließend auf 60°C abkühlen.	10 mM MgCl ₂ 10 mM Glukose
Dyt Medium	1,6% Bacto-tryptone 1% Bacto Hefe Extrakt 100 mM NaCl
LB Medium	1% Bacto-tryptone 0,5% Bacto Hefe Extrakt

	200 mM NaCl
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	
Y-broth	LB Medium 4 mM MgSO ₄ 5 mM KCl
TFB 1	15% Glycerin 10 mM CaCl ₂ 30 mM Kaliumacetat
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen	
	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂
TFB 2	15% Glycerin 10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl
LB Medium	1% Bacto-tryptone 0,5% Bacto Hefe Extrakt 200 mM NaCl
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	

Herstellung kompetenter Bakterien

[0051] XL1blue Bakterien wurden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Morgens wurden einige Kolonien mit je 2 ml Y-broth angeimpft und 2 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden diese Vorkulturen in 500 ml Y-broth gegossen und bis zu einer OD bei 600 nm von 0,3–0,35 inkubiert. Dann wurde die Kultur auf zwei 50 ml Polypropylenröhrchen verteilt, kurz auf Eis gestellt und bei 4°C und 2000 g pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in je 15 ml in TFB 1 (15% Glycerin, 10 mM CaCl₂, 30 mM Kaliumacetat, mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂) resuspendiert und 60–90 Minuten auf Eis gestellt.

[0052] Anschließend wurde erneut mit 2000 g pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in je 2 ml TFB 2 (15% Glycerin, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl) resuspendiert. Die Bakterien wurden dann in 200 µl Aliquots aufgeteilt und sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei –80°C gelagert.

Beispiel 3: ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des humanen CD28

[0053] Die Kavitäten von Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) wurden mit 100 µl monoklonalem Maus anti-Gluthation-S-Transferase (GST) Antikörper (spezifisch für GST aus Schistosoma japonicum, 1:2000 in PBS vorverdünnt) beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur wurden die Kavitäten dreimal mit PBS + 0,1% Tween 20 gewaschen.

[0054] Dann wurde mit 250 µl PBS mit 1% Magermilchpulver und 0,1% Tween 20 für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS + 0,1% Tween 20 gewaschen. Während in die Vertiefungen der Spalten 1 und 2 jeweils 100 µl 1:2 vorverdünntes CD28-GST Antigen (PBS + 0,1% Tween 20) pipettiert wurden, kamen in die Vertiefungen der dritten und vierten Spalte nur je 100 µl PBS + 0,1% Tween 20. Entsprechend wurden die übrigen Spalten der Mikrotiterplatte vorbereitet.

[0055] Nach 1 h bei Raumtemperatur folgten erneut drei Waschschriffe. Anschließend wurden die Patientenserum sowie das positive Kontrollserum, ein polyklonales Kaninchen anti-human CD28 Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg), Konzentration 1 µg/ml, 1:200 in PBS + 0,1% Tween 20 vorverdünnt.

[0056] Der Leerwert enthielt das Antigen, aber kein Kontrollserum, die Negativkontrolle enthielt das Kontrollserum, aber kein Antigen und der Blank enthielt weder Kontrollserum noch Antigen. Jedes Patientenserum wurde in Doppelbestimmungen gegen Antigen und – zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen – gegen PBS + 0,1 %/Tween 20 gemessen.

[0057] Anschließend wurde die Mikrotiterplatte für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Sekundäntikörper hinzugegeben. In die Vertiefungen mit dem Kontrollserum (B 1–4) wurden je 100 µl eines anti Kaninchen IgG Antikörpers (Fc-spezifisch; Sigma, München) und für die Patientenseren je 100 µl eines anti-human IgG Antikörpers (Fc-spezifisch; Sigma, München) verwendet. Beide Antikörper wurden 1:5000 vorverdünnt und sind mit alkalischer Phosphatase markiert. Die Inkubationszeit betrug bei Raumtemperatur 60 min.

[0058] Danach wurde fünfmal gründlich gewaschen und in jede Vertiefung wurden 100 µl der p-Nitrophenyl Substratlösung gegeben (pNPP Substrat Tabletten Set, Sigma, München) und sechzig Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Farbentwicklung wurde nach 30 und nach 60 Minuten bei 405 nm gemessen.

[0059] Das Ergebnis für jedes Serum wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Anti-CD28} = \frac{\text{OD}_{\text{Serum}} [60 \text{ min}] - \text{OD}_{\text{LW}}}{\text{OD}_{\text{LW}}}$$

[0060] Der Quotient wurde für alle getesteten Seren errechnet. Der Grenzwert wurde mit den Seren der gesunden Probanden errechnet. Es zeigte sich, daß 95% aller errechneten Quotienten der gesunden Probanden unter 9 lagen, so daß Werte, die > 10 waren als positiv gewertet wurden, d. h. sie enthielten Autoantikörper gegen CD28.

[0061] Zusätzlich wurden Seren, die sicher keine Autoantikörper gegen CD28 enthielten und solche, die sicher CD28 Autoantikörper enthielten in einer Verdünnungsreihe getestet. Es zeigte sich, dass Seren, die CD28 Autoantikörper enthalten, auch noch bei einer Verdünnung von 1:700 eine eindeutig höhere OD zeigten als die negativen Seren.

[0062] Kreuzreagierende Antikörper in den Patientenseren gegen GST konnten ausgeschlossen werden. Dazu wurden 32 Seren getestet und in keinem Serum fanden sich Antikörper gegen das in diesem ELISA verwendete GST.

Beispiel 4: Untersuchtes Patientenkollektiv bestehend aus 116 Melanompatienten im klinischen Stadium II-IA-C.

[0063] Seren von 116 Patienten mit metastasierendem malignem Melanom im Stadium III wurden untersucht. Die demographischen Daten des untersuchten Kollektivs sind in [Abb. 1](#) (= Tabelle 1) zusammengefasst.

[0064] Das Kollektiv war weitgehend homogen zusammengesetzt, d. h. jeweils ca. ein Drittel der Patienten waren im Stadium IIIA, II-IB und IIIC, so dass die Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten als normalverteilt angenommen werden konnten.

Beispiel 5: Autoantikörper im Serum von Patienten mit malignem Melanom im Stadium IIIA-C.

[0065] In [Abb. 2](#) (= Tabelle 2) ist die Zahl der Patienten mit und ohne Autoantikörper gegen CD28, Anti-Nukleäre Antikörper (ANAs) und anti-Thyreoglobulin-Antikörper vor Beginn einer IF-Na-Therapie im Stadium III aufgeführt. In den fortgeschrittenen Stadien IIIB und IIIC wurden mehr Patienten mit Autoantikörpern gefunden.

Beispiel 5: Vergleich des Progressionsfreies Überlebens und des Gesamtüberlebens zwischen Patienten mit und ohne Autoantikörper gegen CD28

[0066] In [Abb. 3](#) ist das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) der Patienten ohne CD28-Autoantikörper (n = 82) und mit CD28-Autoantikörpern (n = 34) dargestellt. Es sind die Überlebenszeiten seit der Erstdiagnose des klinischen Stadiums III, d. h. dem Auftreten von regionären Metastasen.

[0067] Das PFS betrug bei Patienten mit CD28 Autoantikörpern (CD28+) im Median 39,7 Monate (95% Konfidenzintervall (CI): 21.91; 57.49 Monate) und bei den Patienten ohne Autoantikörper gegen CD28 (CD28-) wurde das mediane Überleben nicht erreicht. Das Signifikanzniveau zwischen den beiden Gruppen betrug p = 0.0657, d. h. es war knapp signifikant.

[0068] Das OS betrug bei Patienten mit CD28 Autoantikörpern (CD28+) im Median 51.3 Monate (95% CI: 0.00; 111.04 Monate). Bei Patienten ohne CD28 Autoantikörper im Serum (CD28-) wurde das mediane Überleben nicht erreicht. Das Gesamtüberleben war für Patienten mit Autoantikörpern gegen CD28 hochsignifikant schlechter ($p = 0.0074$).

Beispiel 6: Vergleich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens bei Patienten mit verschiedenen Autoantikörpern.

[0069] Im Folgenden wurden Patienten verglichen, die entweder keine Autoantikörper im Serum hatten oder nur Autoantikörper gegen CD28 oder nur ANAs bzw. anti-Schilddrüsen Antikörper. Eine weitere Gruppe bildeten die Patienten, die Autoantikörper gegen alle getesteten Antigene hatten.

[0070] In [Abb. 4](#) sind das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) der verschiedenen Patientengruppen mit Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Die Grafiken zeigen, dass das Überleben dann schlechter ist, wenn anti-CD28 Autoantikörper vorhanden sind ($p < 0.05$). Die Anwesenheit der anderen Autoantikörper, die das Gesamtüberleben positiv beeinflussen, kann diesen nachteiligen Effekt auf die Prognose der Melanopatienten nicht ausgleichen.

[0071] Das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen CD28 ist auch nach Durchführung einer Varianzanalyse mit anderen relevanten Parametern wie Alter, Geschlecht und Tumorstadium die einzig signifikante Einflußgröße für das Gesamtüberleben der untersuchten Patienten ([Abb. 5](#) = Tabelle 3).

Beispiel 7: Vergleich des Auftretens von Autoantikörpern vor und nach IFN α Therapie.

[0072] In [Abb. 6](#) (= Tabelle 4) ist die Zahl der Patienten mit und ohne Autoantikörper gegen CD28, ANAs und anti-Thyreoglobulin-Antikörper vor und nach einer IFN α -Therapie im Stadium III aufgeführt. [Abb. 7](#) zeigt die Titer der Autoantikörper im Serum der Melanopatienten vor und nach einer IFN α -Therapie.

[0073] Die beiden Abbildungen zeigen, dass sowohl die Zahl der Patienten mit Autoantikörpern als auch die Serumtiter durch die IFN α -Therapie deutlich gesteigert werden. Insbesondere die Titer der Autoantikörper gegen CD28 und gegen Schilddrüsen Gewebe werden signifikant durch die IFN α -Therapie gesteigert.

Beispiel 8: Vergleich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens bei Patienten mit und ohne Autoantikörper gegen CD28 nach Durchführung einer IFN α -Therapie.

[0074] Sowohl das progressionsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben war bei Melanopatienten, die Autoantikörper gegen CD28 produzieren, nach Beginn einer IFN α -Therapie deutlich verschlechtert ([Abb. 8](#)). Bereits 18 Monate nach Beginn der Therapie mit IFN α verschlechterten sich sowohl das progressionsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben der Patienten, die Autoantikörper gegen CD28 entwickelten.

Abbildungen:

[0075] [Abb. 1](#): Demographie des untersuchten Patientenkollektivs, das aus Seren von 116 Melanopatienten im Stadium III (AJCC 2002) bestand.

[0076] [Abb. 2](#): Autoantikörper bei Patienten im Stadium IIIA–C vor Beginn einer IFN α Therapie.

[0077] [Abb. 3](#): Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben (A) und das Gesamtüberleben (B) der Patienten mit und ohne anti-CD28 Autoantikörper ($n = 116$).

[0078] [Abb. 4](#): Kaplan-Meier-Kurven für das Progressionsfreie-(A) und das Gesamtüberleben (B) der Patienten mit malignem Melanom im Stadium III ($n = 116$). Die verschiedenen Patientengruppen sind: CD28-/Auto-Ak-, CD28+/Auto-Ak-, CD28-/Auto-Ak+ und CD28+/Auto-Ak+.

[0079] [Abb. 5](#): Univariate Cox Regressions Analyse des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens. CI, Konfidenz Intervall, NE nicht evaluierbar, and NR nicht erreicht. P-Werte wurden mit dem Wald-Test berechnet.

[0080] [Abb. 6](#): Autoantikörper im Serum von Patienten vor und nach IFN α Therapie im Stadium III.

[0081] Abb. 7: Die Produktion von anti-CD28 Autoantikörpern wird durch eine Interferon-Therapie signifikant gesteigert, d. h. mehr Patienten produzieren diese Autoantikörper. Das gilt auch für ANAs und anti-Thyreoglobulin-Autoantikörper.

[0082] Abb. 8: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben der Patienten ohne CD28-Autoantikörper und mit CD28-Autoantikörpern nach Behandlung mit Interferon-alpha. Zeit seit Beginn der IFN α -Therapie im Stadium III.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

<120> Verwendung von Autoantikörpern gegen CD28 als prognostischer Marker
beim malignen Melanom

<130> P 74230

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(150)

<223> extrazellulärer Bereich (IgG-artige Domäne ohne Transmembranregion und Signalpeptid)

<400> 1

```

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1                               10                               15
Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
20                               25                               30
Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
35                               40                               45
Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
50                               55                               60
Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65                               70                               75                               80
Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
85                               90                               95
Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
100                              105                              110
Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
115                              120                              125
Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
130                              135                              140
Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145                              150                              155                              160
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
165                              170                              175
Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
180                              185                              190
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
195                              200                              205
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210                              215                              220

```

DE 10 2007 023 183 A1 2008.11.20

<210> 2
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Pro Ser Ile Gln Val Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro
 1 5 10 15
 Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser
 20 25 30
 Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu
 35 40 45
 Asp Ser Ala Val Glu Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln
 50 55 60
 Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr
 85 90 95
 Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu
 100 105 110
 Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His
 115 120 125
 Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
 130 135

<210> 3
 <211> 3804
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 taaagtcatc aaaacaacgt tatatcctgt gtgaaatgct gcagtcagga tgccttggtg 60
 tttgagtgcc ttgatcatgt gccctaaggg gatggtggcg gtgggtggtg ccgtggatga 120
 cggagactct caggccttgg cagggtgcgtc tttcagttcc cctcacactt cgggttcctc 180
 ggggaggagg ggctggaacc ctagcccatc gtcaggacaa agatgctcag gctgctcttg 240
 gctctcaact tattcccttc aattcaagta acaggaaaca agattttggg gaagcagtcg 300
 cccatgcttg tagcgtacga caatgcggtc aaccttagct gcaagtattc ctacaatctc 360
 ttctcaaggg agttccgggc atcccttcac aaaggactgg atagtgctgt ggaagtctgt 420
 gttgtatatg ggaattactc ccagcagctt caggtttact caaaaacggg gttcaactgt 480
 gatgggaaat tgggcaatga atcagtgaca ttctacctcc agaatttgta tgtaaccaa 540
 acagatattt acttctgcaa aattgaagtt atgtatcctc ctccttacct agacaatgag 600
 aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa gggaaacacc tttgtccaag tcccctattt 660
 cccggacctt ctaagccctt ttgggtgctg gtgggtggtg gtggagtcct ggcttgctat 720
 agcttgctag taacagtggc ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc 780
 ctgcacagtg actacatgaa catgactccc cgccgccccg ggcccacccg caagcattac 840
 cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgct cctgacacgg acgcctatcc 900
 agaagccagc cggctggcag cccccatctg ctcaatatca ctgctctgga taggaaatga 960
 ccgccatctc cagccggcca cctcaggccc ctggtgggcc accaatgcca atttttctcg 1020
 agtgactaga ccaaatatca agatcatttt gagactctga aatgaagtaa aagagatttc 1080
 ctgtgacagg ccaagtctta cagtgccatg gccacattc caacttacca tgtacttagt 1140
 cagcttgactg agaagttagg gtagaaaaca aaaaggaggt ggattctggg agcctcttcc 1200
 ctttctcact cacctgcaca tctcagtcaa gcaaagtgtg gtatccacag acattttagt 1260
 tgcagaagaa aggctaggaa atcattcctt ttgggttaaat ggggtgttaa tcttttggtt 1320
 agtgggttaa acggggttag ttagagtagg gggagggata ggaagacata tttaaaaacc 1380
 attaaaacac tgtctcccac tcatgaaatg agccacgtag ttctatttta atgctgtttt 1440

DE 10 2007 023 183 A1 2008.11.20

ccttttagttt	agaaatacat	agacattgtc	ttttatgaat	tctgatcata	tttagtcatt	1500
ttgaccaa	gagggatttg	gtcaaatgag	ggattccctc	aaagcaatat	caggtaaacc	1560
aagttgcttt	cctcactccc	tgatcatgaga	cttcagtgtt	aatgttcaca	atatactttc	1620
gaaagaataa	aatagttctc	ctacatgaag	aaagaatatg	tcaggaata	aggtcacttt	1680
atgtcaaaat	tatttgagta	ctatgggacc	tggcgcagtg	gctcatgctt	gtaatcccag	1740
cactttggga	ggcggaggtg	ggcagatcac	ttgagatcag	gaccagcctg	gtcaagatgg	1800
tgaaactccg	tctgtactaa	aaatacaaaa	tttagcttgg	cctggtggca	ggcacctgta	1860
atcccagctg	cccaggaggc	tgaggcatga	gaatcgcttg	aacctggcag	gcgagggttg	1920
cagtgagccg	agatagtgcc	acagctctcc	agcctgggcg	acagagtgag	actccatctc	1980
aaacaacaac	aacaacaaca	acaacaacaa	caaaccacaa	aattatttga	gtactgtgaa	2040
ggattatttg	tctaacagtt	cattccaatc	agaccaggta	ggagctttcc	tgtttcatat	2100
gtttcaggg	tgacacagttg	gtctctttaa	tgctcggtgtg	gagatccaaa	gtgggttgtg	2160
gaaagagcgt	ccataggaga	agtgagaata	ctgtgaaaag	ggatgttagc	attcattaga	2220
gtatgaggat	gagtcccaag	aaggttcttt	ggaaggagga	cgaatagaat	ggagtaatga	2280
aattcttgcc	atgtgctgag	gagatagcca	gcattaggtg	acaatcttcc	agaagtggtc	2340
aggcagaagg	tgccctgggtg	agagctcctt	tacagggact	ttatgtggtt	tagggctcag	2400
agctccaaaa	ctctgggctc	agctgctcct	gtaccttggg	ggtccattca	catgggaaag	2460
tatgttgaa	tggtcttttt	gaagagagca	tcagagttct	taagggactg	ggtaaggcct	2520
gaccctgaaa	tgaccatgga	tatttttcta	cctacagttt	gagtcaacta	gaatatgcct	2580
ggggaccttg	aagaatgccc	ttcagtggtc	ctcaccattt	gttcatgctt	cagttaattc	2640
aggtgttgaa	ggagcttagg	ttttagaggc	acgtagactt	ggttcaagtc	tcgttagtag	2700
ttgaaatagc	tcaggcaagt	cactgcccac	ctaagatgat	ggttcttcaa	ctataaatgg	2760
agataatggt	tacaaatgtc	tcttcctata	gtataatctc	cataagggca	tgGCCcaagt	2820
ctgtctttga	ctctgcctat	ccctgacggt	tagtagcatg	cccacatac	aatgttagct	2880
attggtatta	ttgccatata	gataaattat	gtataaaaat	taaactgggc	aatagcctaa	2940
gaagggggga	atattgtaac	acaaatttaa	accactacg	cagggatgag	gtgctataat	3000
atgaggacct	tttaacttcc	atcattttcc	tgtttcttga	aatagtttat	cttgtaatga	3060
aatataaggc	acctcccact	tttatgtata	gaaagaggtc	ttttaatttt	tttttaatgt	3120
gagaaggaag	ggaggagtag	gaatcttgag	attccatatac	gaaaatactg	tactttgggt	3180
gatttttaag	tgggcttcca	ttccatggat	ttaatcagtc	ccaagaagat	caactcagc	3240
agtacttggg	tgctgaagaa	ctggttgatt	taccctggca	cgtgtgccac	ttgcccagct	3300
tcttgggcac	acagagttct	tcaatccaag	ttatcagatt	gtatttgaaa	atgacagagc	3360
tggagagttt	tttgaatgg	cagtggtgcaa	taaataaata	ctttttttta	aatggaaaga	3420
cttgatctat	ggtaataaat	gattttgttt	tctgactgga	aaaataggcc	tactaaagat	3480
gaatcacact	tgagatgttt	cttactcact	ctgcacagaa	acaagaaga	aatgttatac	3540
agggaaagtcc	gttttcaacta	ttagtatgaa	ccaagaaatg	gttcaaaaac	agtggtagga	3600
gcaatgcttt	catagtttca	gatatggtag	ttatgaagaa	aacaatgtca	tttgctgcta	3660
ttattgtaag	agtcttataa	ttaatggtag	tcctataatt	tttgattgtg	agctcaccta	3720
tttgggttaa	gcatgccaat	ttaaagagac	caagtgtatg	tacattatgt	tctacatatt	3780
cagtgataaa	attactaaac	tact				3804

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 4
 aaagaattcc cttcaattca agtaacagga aac

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 5
 aaacccggga aataggggac ttggacaaag

30

<210> 6
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Phe Pro Ser Ile Gln Val Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser
 1 5 10 15
 Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly
 35 40 45
 Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln
 50 55 60
 Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu
 65 70 75 80
 Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln
 85 90 95
 Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 100 105 110
 Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys
 115 120 125
 His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser
 130 135 140

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ et al. Final version of the American Joint Committee an Cancer staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol 2001; 19: 3635–48. [0002]
- Harpio R, Einarsson R. S100 Proteins as cancer biomarkers with focus an S100B in malignant melanoma. Clin Biochem 2004; 37: 512–8 [0002]
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ et al., a. a. O.; Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS et al. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. J Clin Oncol 1996; 14: 7–17 [0008]
- Gogas H, Ioannovich J, Dafni U et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. N Engl J Med 2006; 354: 709–18 [0008]
- Lughtenberg, B. (1975), FEBS Lett. 58, 254 [0031]

Patentansprüche

1. Verwendung von CD28 als Nachweisreagenz für anti-CD28 Autoantikörper zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom.
2. Verfahren zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe eines Patienten auf das Vorhandensein von anti-CD28 Autoantikörpern untersucht, indem man die Probe mit CD28 in Kontakt bringt, wobei eine Bindung der Autoantikörper an CD28 auf eine signifikant schlechtere Überlebensprognose des Patienten mit malignem Melanom hinweist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß CD28 ein CD28-Molekül ganzer Länge gemäß SEQ ID NO:1 oder ein extrazelluläres Fragment davon gemäß SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:6 oder ein zum Nachweis von anti-CD28 Autoantikörpern geeigneter Teil dieses Fragments ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das CD28-Molekül ganzer Länge oder das extrazelluläre Fragment davon Teil eines Fusionsproteins sind.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein ferner Glutathion-S-Transferase umfaßt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe eine Blutprobe, Plasmaprobe oder Serumprobe ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß CD28 an einen Träger gebunden ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die Bindung von anti-CD28 Autoantikörpern an CD28 untersucht, indem man den Träger mit markierten anti-Immunglobulin-Antikörpern gegen Antikörper der Spezies, der der Patient angehört, kontaktiert und die markierten Antikörper nachweist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Patient ein Mensch ist und die anti-Immunglobulin-Antikörper anti-humane Immunglobulin-Antikörper sind.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß die anti-Immunglobulin-Antikörper mit einem Enzym, Biotin, einem radioaktiven Isotop oder einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Untersuchung in einem Blot, einem ELISA, einem RIA, einer FACS-Untersuchung oder in einem Flüssigphasen-Detektionssystem durchführt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine hohe Konzentration von Autoantikörpern gegen CD28 auf ein besonderes Risiko, eine besonders schwere Erkrankung oder eine besondere Schwere der Erkrankung hinweist.
13. Kit zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom, dadurch gekennzeichnet, daß es CD28 und markierte anti-Immunglobulin Antikörper umfaßt.
14. Kit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß CD28 ein CD28-Molekül ganzer Länge gemäß SEQ ID NO:1 oder ein extrazelluläres Fragment davon gemäß SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:6 oder ein zum Nachweis von anti-CD28 Autoantikörpern geeigneter Teil dieses Fragments ist.
15. Kit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das CD28-Molekül ganzer Länge oder das Fragment davon Teil eines Fusionsproteins sind.
16. Kit nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein ferner Glutathion-S-Transferase umfaßt.
17. Kit nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß es ferner markierte anti-IgE Antikörper umfaßt.

18. Kit nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die markierten Antikörper mit einem Enzym, Biotin, einem radioaktiven Isotop oder einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.

19. Verwendung eines Kits nach den Ansprüchen 13 bis 18 zur Bestimmung von anti-CD28 Autoantikörpern als prognostischer Marker für die Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom.

20. Verwendung von anti-CD28 Autoantikörpern als prognostischer Marker zur Bestimmung der Überlebensprognose bei Patienten mit malignem Melanom.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1**Tabelle 1.**

Charakteristika	Patienten (n = 116)
Alter [Jahre] Median	56.7
Geschlecht [Anzahl (%)]	
Männlich	67 (58)
Weiblich	49 (42)
AJCC Stadium [Anzahl (%)]	
IIIA	24 (20.6)
IIIB	46 (39.7)
IIIC	46 (39.7)

Abbildung 2**Tabelle 2.**

Autoantikörper	Alle Patienten (n = 116)	AJCC Stadium		
		IIIA (n=24)	IIIB (n=46)	IIIC (n=46)
<i>Anzahl Patienten (%)</i>				
Autoantikörper	47 (40.5)	9 (37.5)	20 (43.5)	18 (39.1)
Anti-CD28	34 (29.3)	7 (29.3)	14 (30.4)	13 (28.3)
Antithyroid	7 (6.0)	0	3(6.5)	4 (8.7)
Antinuclear	20 (17.2)	3 (12.5)	11 (23.9)	6 (13.0)

Abbildung 3

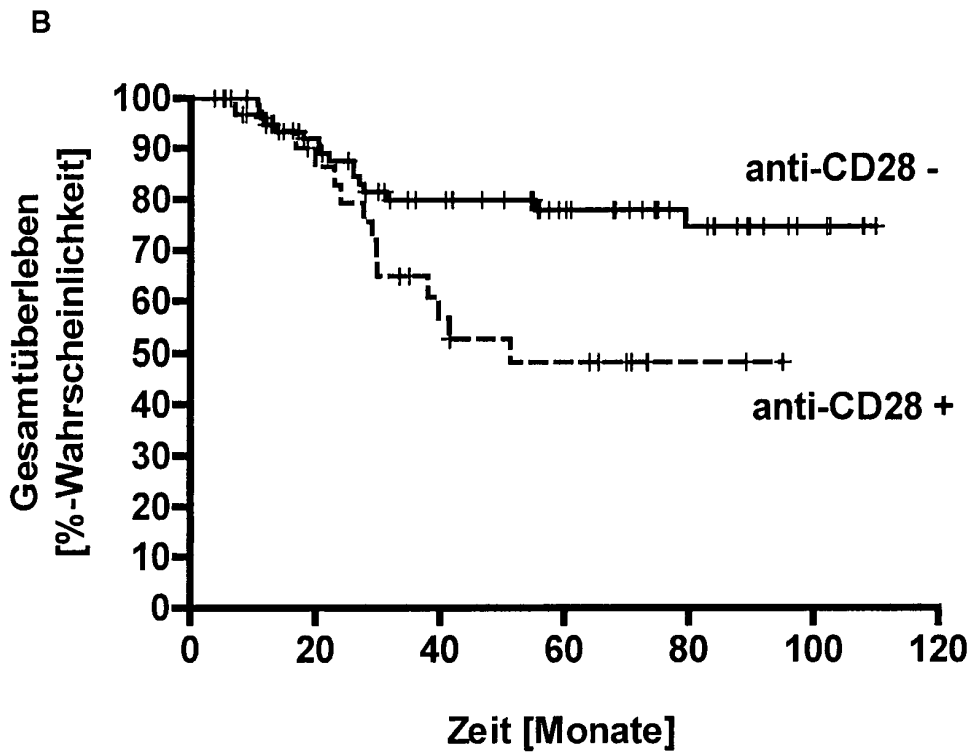
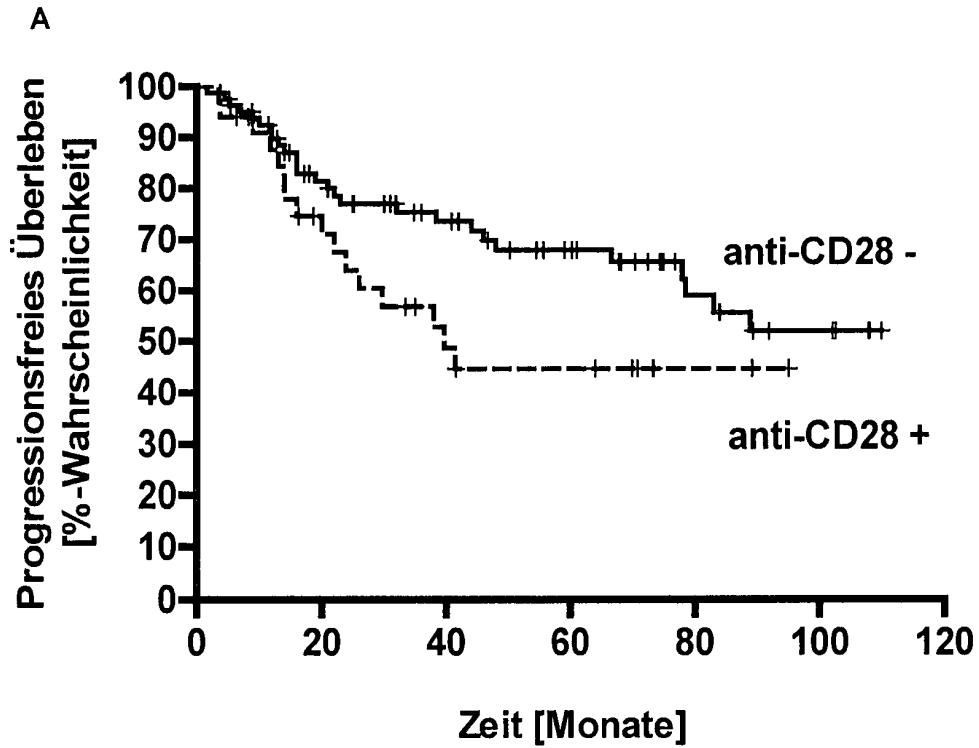
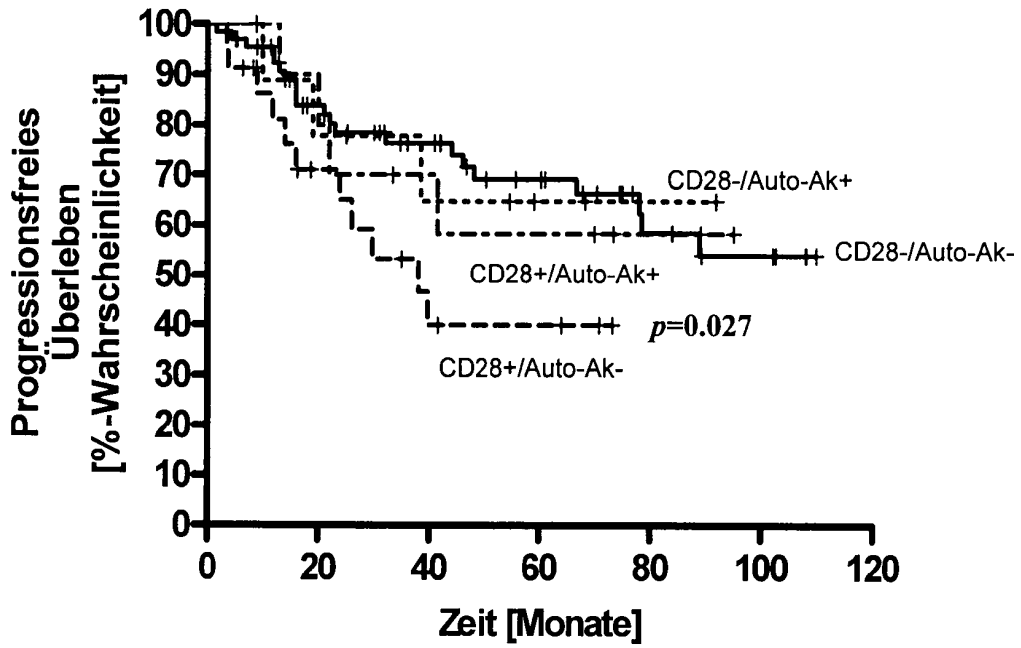


Abbildung 4

A



B

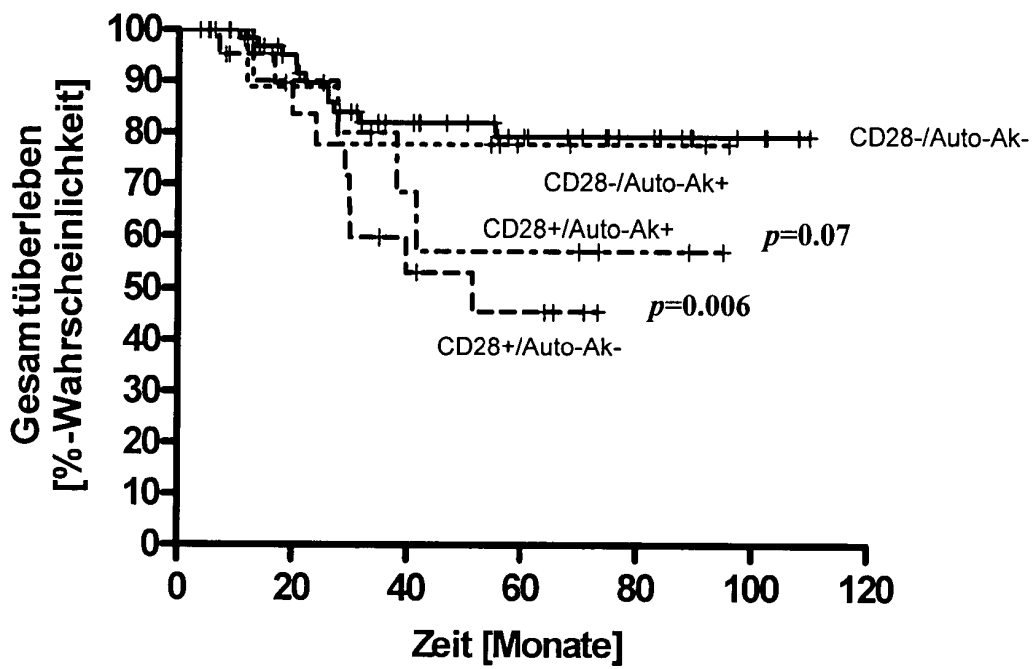


Abbildung 5

Tabelle 3:

Variable	Progressionsfreies Überleben		Gesamtüberleben		P Wert ⁺
	Rate <i>Anzahl Ereignisse/ Anzahl Patienten</i>	Mediane Dauer (95% CI) <i>mo</i>	Rate <i>Anzahl Ereignisse/ Anzahl Patienten</i>	Mediane Dauer (95% CI) <i>mo</i>	
Alter (Jahre)					
<56	18/54	88.9 (NE) 133.0 (33.29; 232.7)	11/54	NR (NE) 141.3 (54.3; 228.3)	0.417
≥56	26/62		20/62		
Geschlecht					
Male	27/67	88.9 (NE) 133.0 (68.1; 197.9)	19/67	NR (NE) 141.3 (54.3; 228.3)	0.382
Female	17/49		12/49		
Stadium (AJCC 2002)					
IIIA	5/24	NR (NE)	4/24	NR (NE)	0.246
IIIB	18/46	NR (NE)	11/46	NR (NE)	
IIIC	21/46	88.9 (14.2; 163.6)	16/46	141.3 (53.5; 229.1)	
Anti-CD28 auto-Ak					
Ja	27/82	NR (NE)	16/82	NR (NE)	0.020
Nein	17/34	39.7 (21.9; 57.5)	15/34	51.3 (0.0; 111.04)	
Autoantikörper (auto-Ak)					
Ja	33/91	88.9 (41.9; 135.8)	21/91	NR (NE)	0.586
Nein	11/25	83.0 (NE)	10/25	NR (NE)	

Abbildung 6**Tabelle 4.**

Autoantikörper	Alle Patienten (n=45)	
	vor IFN α	Nach IFN α
	<i>Anzahl Patienten (%)</i>	
Autoantikörper	17 (37.8)	21 (46.7)
Anti-CD28	13 (28.9)	19 (42.2)
ANA	6 (13.3)	7 (15.6)
Anti-Thyreoglobulin	2 (4.4)	6 (13.3)

Abbildung 7

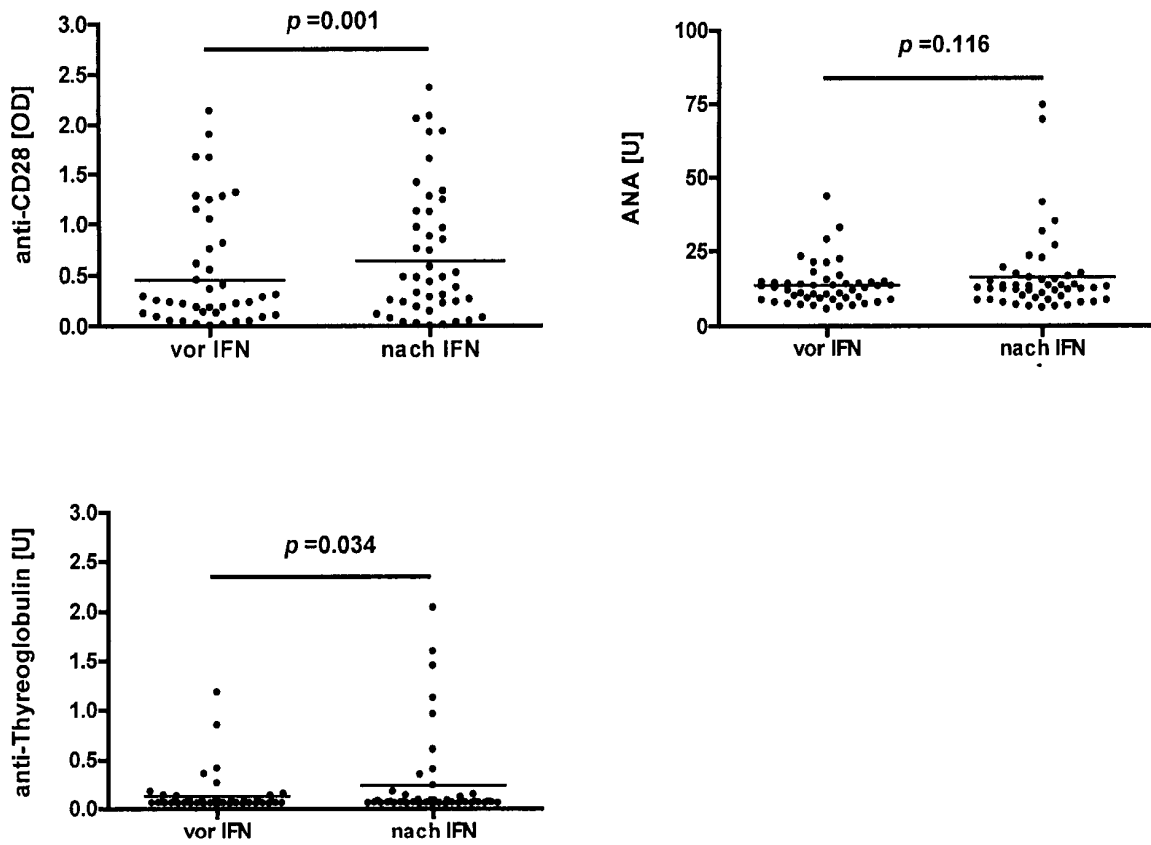
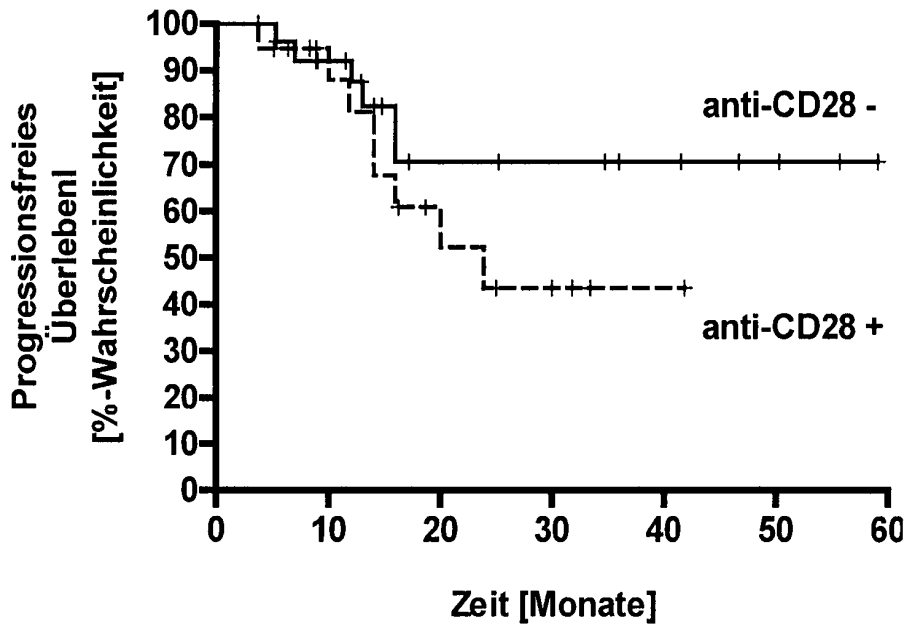


Abbildung 8

A



B

